

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**“ACTIVIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES Y  
EFECTO ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS  
SECUNDARIOS DEL EXTRACTO ACUOSO DEL *Allium  
sativum* var. Huaralino (AJO) EN MODELOS *in vitro*.”**

**TESIS**

**Para optar al Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica**

**AUTOR**

**Silvia Suárez Cunza**

**ASESOR**

**Américo Castro Luna**

**Lima – Perú**

**2014**

A mi madre, Celinda, por su amor y apoyo incondicional

A mis hijos, Carlos y Paloma, por su aliento y comprensión

A Ernesto, por su compañía y fe

A la memoria de mi padre Carlos, modelo de honestidad

A la memoria de Alejandra, mi angelito

A la memoria de la Dra. Luz Oyola Hermoso, maestra y amiga

A la memoria de la Dra. Raquel Oré Sifuentes, compañera y gran amiga

## **AGRADECIMIENTO**

- A mi alma mater, la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por la formación en mi carrera profesional y académica.
- Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición Alberto Guzmán Barrón, a todo el personal docente y administrativo, por brindarme un ambiente placentero y la oportunidad de desarrollarme académicamente.
- A mi asesor, el doctor Américo Castro Luna, por su aceptación, por su invalorable tiempo y gran orientación.
- A mi colega y amiga Mg. Inés Arnao y a todas las personas que me brindaron su aliento y contribuyeron alcanzar esta meta.
- A la Estación Experimental Donoso de la provincia de Huaral, por la donación de las muestras del Ajo Huaralino

### **❖ AGRADECIMIENTO ESPECIAL A LOS MIEMBROS DEL JURADO**

por la calidad de sus observaciones y sugerencias

- Dr. Pablo Bonilla Rivera (Presidente)
- Dra. Elizabeth Gonzáles Loayza
- Dr. Jorge Arroyo Acevedo
- Dra. Elena Benavides Rivera
- Dr. Américo Castro Luna (Asesor)

## ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	X
SUMMARY	XI
RESUMO	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Clasificación botánica	4
2.2 Compuestos bioactivos	5
2.3 S-Nitrosotiol: importancia biológica	8
2.4 Radicales libres y especies reactivas derivadas del oxígeno	11
2.4.1 EROs y enfermedades	13
2.5 Estrés oxidativo y antioxidantes	14
2.6 Propiedades antioxidantes <i>in vitro</i>	16
2.6.1 Ensayos químicos para demostrar capacidad antioxidante	16
2.6.2 Captación de especies reactivas del oxígeno	18
2.6.3 Indicadores de estrés oxidativo	18
2.7 Respiración mitocondrial	19
III. METODOLOGÍA	21
3.1 Muestra biológica	21
3.2 Preparación del extracto de ajo	21
3.3 Reactivos	23
3.4 Equipos	24
3.5 Análisis realizados	24
3.5.1 Cuantificación espectrofotométrica de Alicina	25
3.5.2 Formación de S - Nitrosotioles	26

3.5.3 Determinación de proteínas solubles	28
3.5.4 Determinación de tioles proteicos y tioles de bajo peso molecular	29
3.5.5 Determinación de polifenoles	29
3.5.6 Determinación de flavonoides	30
3.5.7 Capacidad antioxidante total empleando el radical ABTS <sup>•+</sup>	31
3.5.8 Capacidad antioxidante total empleando el radical DPPH	31
3.5.9 Captación del radical superóxido	32
3.5.10 Capacidad de descomposición del peróxido de hidrógeno (CDP)	32
3.5.11 Determinación de poder reductor (FRAP)	33
3.5.12 Análisis de metales asociados a defensa antioxidante	34
3.5.13 Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	34
3.5.13.1 Formación de carbonilos proteico por oxidación de albúmina	34
3.5.13.1 Inducción de estrés oxidativo en un modelo <i>in vitro</i> en eritrocitos humanos	37
3.5.13.2 Ensayo de control respiratorio en mitocondria de hígado de rata	39
 IV. RESULTADOS	 43
4.1 Cuantificación espectrofotométrica de Alicina	43
4.2 Formación de S – Nitrosotioles	44
4.3 Determinación de proteínas solubles	46
4.4 Determinación de tioles proteicos y tioles de bajo peso molecular	46
4.5 Determinación de polifenoles	48
4.6 Determinación de flavonoides	48
4.7 Capacidad antioxidante total empleando el radical ABTS <sup>•+</sup>	49
4.8 Capacidad antioxidante total empleando el radical DPPH	51
4.9 Captación del radical superóxido	52
4.10 Capacidad de descomposición del peróxido de hidrógeno	54
4.11 Determinación de poder reductor	55
4.12 Análisis de metales asociados a defensa antioxidante	55
4.13 Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	56

4.13.1 Formación de carbonilos proteico por oxidación de albúmina	56
4.13.2 Inducción de estrés oxidativo en un modelo <i>in vitro</i> en eritrocitos humanos	57
4.13.3 Ensayo de control respiratorio en mitocondria de hígado de rata	58
 V. DISCUSIÓN	 60
VI. CONCLUSIONES	74
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
VIII. ANEXOS	81

## Lista de Tablas

- Tabla 1.** Preparación de los tubos de reacción para la determinación de alicina.
- Tabla 2.** Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Glutación – Nitrito.
- Tabla 3.** Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Allium – Nitrito.
- Tabla 4.** Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Albúmina – Nitrito.
- Tabla 5.** Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Allium - Glutación – Nitrito.
- Tabla 6.** Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Allium - Albúmina – Nitrito.
- Tabla 7.** Determinación de polifenoles totales (TPC).
- Tabla 8.** Determinación de la capacidad de descomposición de peróxido de hidrógeno (CDP).
- Tabla 9.** Preparación de los medios denominados I, II, III y medio de reacción para el aislamiento de mitocondria de hígado de rata.
- Tabla 10.** Evaluación del control respiratorio mitocondrial en presencia de EGTA.
- Tabla 11.** Evaluación del control respiratorio mitocondrial en ausencia de EGTA.
- Tabla 12.** Evaluación del control respiratorio mitocondrial en presencia de calcio.
- Tabla 13.** Comportamiento de diversos extractos de *Allium sativum* variedad Huaralino frente a la captación de ABTS<sup>+</sup>.
- Tabla 14.** Comportamiento de diversos extractos de *Allium sativum* variedad Huaralino frente a la captación del radical DPPH.
- Tabla 15.** Resultados del comportamiento de extractos de *Allium sativum* variedad Huaralino frente a la captación del radical superóxido y frente al peróxido de hidrógeno.
- Tabla 16.** Minerales determinados por análisis multielemental mediante inducción de plasma acoplada.

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Principales compuestos bioactivos azufrados del *Allium sativum*

**Figura 2.** Generación de varias especies azufradas reactivas desde un tiol el cual podría ser el glutatión o un grupo sulfhidrilo en una cisteína

**Figura 3.** Principales especies reactivas del oxígeno (EROs) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) derivadas de la conversión biológica del oxígeno en superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ )

**Figura 4.** Formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) y defensas antioxidantes.

**Figura 5.** Incremento de ROS por varias rutas bajo condiciones diabéticas.

**Figura 6.** Estados Metabólicos de las mitocondrias.

**Figura 7.** Flujograma de los ensayos realizados en la muestra de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 8.** Bulbos de *Allium sativum* variedad Huaralino (Estación Donoso, Huaral).

**Figura 9.** Determinación de carbonilos en albúmina y ajo oxidados con peróxido de hidrógeno.

**Figura 10.** Concentraciones de *Allium sativum* variedad Huaralino (mg/mL) frente al cambio de absorbancia medido a 324 nm después de 30 minutos.

**Figura 11.** Formación de nitrosotioles. GSH (mM), Albúmina (mg/mL), Ajo (mg/mL). Concentración de nitrito: 0,9 mM.

**Figura 12.** Nitrosotioles formados con GSH y extracto de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 13.** Nitrosotioles formados con Albúmina y extracto de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 14.** Proteínas solubles en extractos acuoso, buffer, etanólico y en medio TCA de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 15.** Resultados de tioles proteicos en extractos de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 16.** Resultados de tioles de bajo peso molecular en extractos de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 17.** Polifenoles y Flavonoides en extractos acuoso, metanólico y etanólico de *Allium sativum* variedad Huaralino.



**Figura 18.** Cinética de extractos de *Allium sativum* variedad Huaralino frente a la captación de ABTS<sup>•+</sup>.

**Figura 19.** Cinética de extractos de *Allium sativum* variedad Huaralino en la estabilización de la captación de ABTS<sup>•+</sup>.

**Figura 20.** Cinética de extractos de *Allium sativum* variedad Huaralino frente a la captación del radical DPPH.

**Figura 21.** Curva de captación de radical superóxido del extracto acuoso de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 22.** Curva de captación de radical superóxido del extracto tamponado de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 23.** Curva de capacidad de descomposición del peróxido de hidrógeno del extracto tamponado de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 24.** Poder reductor del extracto acuoso de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 25.** Prevención de la formación de carbonilos proteicos por efecto de la presencia del extracto acuoso de *Allium sativum* variedad Huaralino.

**Figura 26.** Prevención de la formación de TBARS por efecto de la presencia del extracto acuoso de *Allium sativum* variedad Huaralino en un modelo de estrés oxidativo in vitro en eritrocito humano.

**Figura 27.** Efecto del tratamiento in vitro de *Allium sativum* variedad Huaralino sobre las velocidades de respiración fosforilante ( $V_3$ ) y en reposo ( $V_4$ ) de mitocondria de hígado de rata.

**Figura 28.** Índice de control respiratorio (ICR) determinado de la relación  $V_3/V_4$  de mitocondria de hígado de rata.

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad captadora de radicales y el efecto antioxidante del bulbo de *Allium sativum* variedad Huaralino mediante técnicas químicas y bioquímicas *in vitro*. El extracto del bulbo se preparó en agua bidestilada en concentraciones de 20 – 40 mg/mL. Los ensayos para estudiar metabolitos secundarios azufrados y sus propiedades fueron la cuantificación de alicina y compuestos orgánicos con grupo tiol; y la formación de nitrosotioles. Para los metabolitos oxigenados se evaluaron polifenoles y flavonoides. La capacidad de captar radicales libres se determinó por las técnicas de ABTS<sup>•+</sup>, DPPH, captación de radical superóxido, descomposición de peróxido de hidrógeno y FRAP; todos los ensayos fueron espectrofotométricos. También se cuantificó minerales por absorción atómica. Los ensayos para estudiar capacidad antioxidante *in vitro* se hicieron por formación de carbonilos en albúmina tratada con peróxido de hidrógeno y niveles de TBARS en glóbulos rojos tratados también con peróxido de hidrógeno. Se realizó la determinación de V<sub>3</sub>, V<sub>4</sub> e ICR, en mitocondria aislada de hígado de rata, por polarografía. Los principales resultados sobre metabolitos azufrados y oxigenados fueron: a) alicina 2,8 mg/g de bulbo fresco pelado, b) tioles de bajo peso molecular 0,95 µmol Cis/g masa seca, c) polifenoles 2,52 mg EAG/g masa seca y d) 1,71 mg EQ/g masa seca. La captación de radicales libres lo realizó mediante la donación de hidrógenos, la donación y captación de electrones, la captación de superóxido, la descomposición de peróxido de hidrógeno y la reducción del hierro férrico. El extracto ejerce protección antioxidante disminuyendo significativamente ( $p < 0,05$ ) la formación de carbonilos y los niveles de TBARS. También disminuye el ICR dependiendo de la concentración del extracto. En conclusión, el extracto acuoso del bulbo de *Allium sativum* variedad Huaralino tiene metabolitos antioxidantes azufrados y oxigenados con capacidad de captar radicales libres que ejercen efecto antioxidante *in vitro*, comparables con la literatura internacional.

**Palabras clave:** *Allium sativum*, radicales libres, actividad antioxidante, metabolitos secundarios.

## SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the radical scavenging activity and the antioxidant effect of *Allium sativum* bulb variety Huaralino by chemical and

biochemical in vitro techniques. The bulb extract was prepared in double distilled water at concentrations of 20 - 40 mg/mL. Assays for studying sulfur secondary metabolites and their properties were quantification of allicin and organic compounds with thiol group; and the formation of nitrosothiols. For oxygenated metabolites were evaluated polyphenols and flavonoids. The ability to capture free radicals was determined by the techniques of ABTS<sup>•+</sup> and DPPH radicals also capture of superoxide, hydrogen peroxide decomposition and FRAP; all of them for spectrophotometry. Mineral was also quantified by atomic absorption. Assays for in vitro antioxidant activity study made by carbonyl formation in albumin treated with hydrogen peroxide and TBARS levels in red blood cells also treated with hydrogen peroxide. Determination of V<sub>3</sub>, V<sub>4</sub> and ICR was performed on isolated mitochondria of rat liver by polarography. The main results of sulfur and oxygenated metabolites were: a) allicin 2,8 mg/g of fresh peeled bulb, b) low molecular weight thiols  $\mu\text{mol}$  0.95 Cys/g dry mass, c) 2.52 mg polyphenols EAG/g dry mass d) EQ 1.71 mg/g dry mass. The free radical scavenging was made by hydrogen donation, donating and electron withdrawing, superoxide uptake, decomposition of hydrogen peroxide and ferric iron reduction. The extract has antioxidant protection decreasing significantly ( $p < 0.05$ ) the formation of carbonyl and TBARS levels. ICR also decreases depending on the concentration of the extract. In conclusion, the aqueous extract of *Allium sativum* bulb variety Huaralino has sulfur and oxygenated antioxidant metabolites capable of capturing free radicals which exert antioxidant effect in vitro, comparable with the international literature.

**Keywords:** *Allium sativum*, free radicals, antioxidant activity, secondary metabolites.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade sequestradora de radicais e o efeito antioxidante do bulbo do *Allium sativum* variedade Huaralino por técnicas químicas e bioquímicas in vitro. O extracto do bulbo foi preparado em água bi-destilada em concentrações de 20 - 40 mg/mL. Os ensaios para estudar metabólitos secundários de enxofre e as suas propriedades foram a quantificação de alicina e compostos orgânicos com grupo tiol; e a formação de nitrosotióis. Para metabólitos oxigenados avaliou-se polifenóis e flavonóides. A capacidade de capturar os radicais livres foi determinada por meio das técnicas de ABTS  $\cdot^+$ , DPPH, captura do radical superóxido, a decomposição de peróxido de hidrogénio e FRAP. Todos estes ensaios foram espectrofotométricos. Também foi quantificado minerais por absorção atómica. Ensaio para estudar atividade antioxidante in vitro foram feitos por formação de carbonilos em albumina tratados de peróxido de hidrogénio e com níveis de TBARS em células vermelhas do sangue, também tratada com peróxido de hidrogénio. A determinação de V3, V4 e ICR por polarografia foi realizada em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os principais resultados de enxofre e de metabólitos oxigenados foram: a) alicina 2,8 mg/g de bulbo fresco descascado, b) tióis de baixos peso molecular, 0,95  $\mu\text{mol}$  Cis/g de massa seca, c) polifenóis, 2,52 mg de EAG/g de massa seca d) flavonoides, 1,71 mg EQ/g de massa seca. A eliminação de radicais livres foi feito por doação de hidrogénio, doando e captando electrões, a captação de superóxido, a decomposição do peróxido de hidrogénio e redução de ferro férrico. O extracto tem uma protecção antioxidante ao diminuir significativamente ( $p < 0,05$ ) a formação de níveis de carbonilo e de TBARS. ICR também diminui, dependendo da concentração do extracto. Em conclusão, o extrato aquoso do bulbo de *Allium sativum* variedade Huaralino tem compostos com atividade antioxidante de enxofre e capaz de capturar radicais livres de oxigénio que exercem efeito antioxidante in vitro, comparável com a literatura internacional.

**Palavras-chave:** *Allium sativum*, radicais livres, atividade antioxidante, metabólitos secundários.

## I. INTRODUCCIÓN

El hombre a través de la historia, ha empleado una serie de fuentes naturales no sólo para su alimentación sino también para paliar una serie de dolencias. Parte de esta riqueza de productos naturales empleados ancestralmente es el *Allium sativum* (ajo, garlic, ail). Constituye uno de los recursos vegetales más antiguo del mundo empleado tanto en el arte culinario como recurso medicinal por sus diversas actividades biológicas y farmacológicas, que incluyen funciones antimicrobianas, antitrombótica, antiateroesclerótica, anticarcinógeno, antiinflamatorio y antioxidante <sup>1-3</sup>.

En las últimas décadas se viene estudiando la capacidad antioxidante de diversos productos naturales debido a que los procesos biológicos implican reacciones redox especialmente en los organismos aerobios; procesos fisiológicos como el envejecimiento, fisiopatológicos como la respuesta inflamatoria y patológicos como la diabetes o enfermedades cardiovasculares son estados en los que la generación de radicales libres y la defensa antioxidante son claves para conservar la homeostasis de los sistemas biológicos y el balance redox <sup>4,5</sup>.

En los sistemas biológicos, se generan radicales libres y moléculas con elevada reactividad desde el momento de la concepción hasta la muerte. Todos ellos constituyen las denominadas especies reactivas del oxígeno (EROs). Estas EROs son necesarias para mantener las funciones fisiológicas en todo organismo aerobio, sin embargo pueden producirse ocasionalmente en cantidades suficientemente elevadas que conducen a estados fisiopatológicos y patológicos.

En las mismas condiciones en las que se producen las EROs, los organismos producen una serie de biomoléculas de pequeño y elevado peso molecular que actúan como parte de un complejo sistema antioxidante enzimático y no enzimático, que permite mantener la homeostasis del estado redox del organismo. Sin embargo, en situaciones en las que se establece un desbalance entre estos dos mecanismos se produce un estado de estrés oxidativo<sup>5</sup>.

El organismo humano además de sintetizar una serie de biomoléculas antioxidantes también utiliza fuentes antioxidantes exógenas, principalmente de fuente vegetal, convirtiendo a las EROs en moléculas con menor potencial injuriante.

Desde hace relativamente poco tiempo se realizan investigaciones rigurosas que crean conocimiento científico para el uso tradicional de nuestros recursos y para mejorar las diversas formas de conocimiento popular. Esta necesidad ha sido creada en respuesta al proceso de globalización, a la creciente demanda de productos naturales en mercados internacionales, aunado además a las exigencias cada vez mayores en cuanto a la calidad del producto en los aspectos físicoquímicos, microbiológicos, genéticos y también en los aspectos bioquímicos, puesto que la optimización de las condiciones de cultivo para conseguir la homogeneidad del recurso debería mantener las cualidades terapéuticas por las que se les conoce tradicionalmente.

El interés de la contribución ha sido aportar conocimientos generados en nuestro país, sobre las propiedades químicas y bioquímicas relacionadas con sus capacidades antioxidantes del *Allium sativum*, cultivado en nuestro territorio; siendo este bulbo producido en diversos países del mundo no todos deberían tener la misma calidad especialmente en el aspecto cuantitativo. Esta contribución podría mejorar el manejo comercial a nivel de los mercados internacionales.

Nuestro país reconocido como territorio megadiverso tiene una variada riqueza de suelos debido a las diversas zonas geográficas, factores edáficos y otros factores ambientales, ello permite plantear que los mecanismos biológicos que dispone este bulbo merece un estudio a nivel químico y bioquímico *in vitro* que sirva de base a próximos estudios *in vivo*.

En el presente trabajo se analiza la variedad Huaralino del *Allium sativum* producido por la Estación Experimental Donoso en la provincia de Huaral, departamento de Lima, ubicado a 188 msnm y a 87,6 km al norte de Lima.

El objetivo principal fue evaluar la actividad captadora de radicales libres y el efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso de este bulbo mediante técnicas químicas y bioquímicas *in vitro*, y con ello suplir parte de la información científica nacional que carece nuestro país.

## II. MARCO TEÓRICO

*Allium sativum* L, conocido como ajo, es una hortaliza cuyo bulbo, de sabor fuerte, especialmente en crudo y ligeramente picante, crece hasta 70cm de altura. La raíz bulbosa, está compuesta de 6 a 20 bulbillos, conocidos como "dientes de ajo", reunidos en su base por medio de una película delgada, formando lo que se conoce como "cabeza de ajos". Cada bulbillo se encuentra envuelto por una túnica blanca, a veces algo rojizo, membranoso, transparente y muy delgado, semejante a las que cubren todo el bulbo<sup>6</sup>.

El término *allium* procede de la palabra celta *all*, que significa ardiente o caliente, mientras que *sativum* es un término latino que significa cultivado. Aunque posee un origen incierto, se le considera oriundo de Asia, desde donde se extendió a toda Europa, y desde allí hacia América, por medio de los conquistadores españoles.

Un tema recurrente del uso del ajo a través de la historia temprana ha sido el consumo por las clases trabajadoras, presumiblemente para mantener e incrementar sus fuerzas y de esa manera tener mayor rendimiento en el trabajo para una mejor productividad. Aunque en el caso de Egipto, también se ha hallado ajos en buen estado de conservación en la tumba del faraón Tutankamón<sup>7</sup>. Asimismo, de esa época también se ha hallado referencias de las aplicaciones del ajo en el *Codex Ebers* (papiro medicinal egipcio) particularmente para dolencias por crecimientos anormales, dolencias circulatorias entre otras.

También la antigua Grecia y Roma han dejado manifestaciones escritas sobre las diversas aplicaciones que en común eran utilizadas para los crecimientos anormales, problemas pulmonares así como la limpieza de las arterias. Antes que los egipcios, los antiguos chinos (2000 AC) lo usaron para la alimentación y como producto medicinal. La Medicina China además lo utilizaba para la depresión. Una característica de esta cultura ha sido el uso combinado de hierbas, el ajo formó parte de la terapia de combinación<sup>7</sup>.

Su llegada a América se dice que fue a través de los exploradores y marinos europeos (españoles, franceses y portugueses), fue empleado inicialmente para los resfríos,

posteriormente como parte del arte culinario y las aplicaciones tradicionales que llegaron desde el viejo continente.

En la actualidad es cultivado y consumido en todo el mundo y también utilizado como componente de recetas farmacéuticas.

## 2.1 Clasificación botánica

Familia: Amaryllidaceae (Liliáceas)

Género: *Allium*

Especie: *sativum*

Nombre científico: *Allium sativum* L.

Nombre común: Ajo

Las cabezas de ajo Huaralino obtenidas de la Estación Experimental Donoso de la ciudad de Huaral, tuvieron en promedio un peso de 51,1 g, un diámetro de 5,72 cm y 14 bulbillos.

En los valles de la costa central (Cañete, Lurín, Lima, Callao, Chancay, Huaral, Barranca y Huacho), su cultivo está dado por su excelente rendimiento, óptima calidad y prolongada conservación del producto. Se producen los cultivares: Huaralino, Barranquino y Cincomesino, la producción en esta zona es dedicado a abastecer principalmente el mercado externo<sup>8</sup>.

A nivel mundial el primer productor de ajos es China, Sudamérica produce en menor cantidad esta hortaliza siendo el mayor productor de la región Argentina, seguido por Brasil y luego se encuentra el Perú, habiéndose cosechado en 8590 ha, la cantidad de 88468 toneladas en el año 2011, según la Food and Agriculture Organization (FAO)<sup>9</sup>.

En nuestro país como en los otros países productores se ensayan nuevos cultivares que expresen diferencias en su composición química, estructura física, fisiológica, bioquímica así como su aptitud comercial e industrial, estos nuevos productos permitirán diseñar estrategias para lograr mejores precios en el mercado nacional e internacional. A este nivel se hace necesaria la investigación científica interdisciplinaria respecto a los factores que permitan la diferenciación del producto, tanto para el consumo en fresco como para la industria.

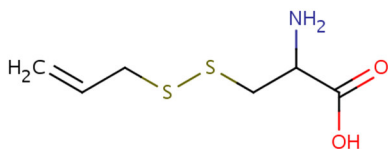


## 2.2 Compuestos bioactivos (metabolitos secundarios)

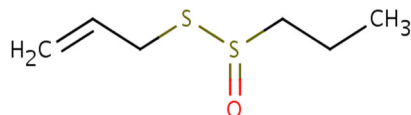
Los “compuestos bioactivos” o fitoquímicos son constituyentes extranutricionales que se producen en pequeñas cantidades en los alimentos principalmente de origen vegetal, son estudiados intensamente con el fin de evaluar sus efectos en la salud. Este interés en el estudio científico se inició debido a que los resultados de muchos estudios epidemiológicos han mostrado efectos protectores en diversas patologías.

La estructura química de los metabolitos son diversos pero ha sido clasificado en grupos químicamente análogos, así están los compuestos fenólicos que abarcan a flavonoides, cumarinas, taninos, estilbenos, etc.; también se tienen compuestos de estructura terpenoide, compuestos nitrogenados y compuestos azufrados. Algunos compuestos tienen propiedades antioxidantes y algunos estudios han mostrado efectos favorables sobre trombosis, tumorigénesis, antibióticos, hipocolesterolémicos y otros<sup>10</sup>. Los compuestos azufrados del ajo por ejemplo tienen acciones anticarcinogénicas en modelos experimentales como también efectos cardioprotectores<sup>11</sup>.

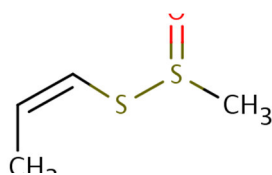
En el *Allium sativum* los principales compuestos bioactivos contienen azufre<sup>12</sup>, los nombres y estructuras de algunos de ellos son:



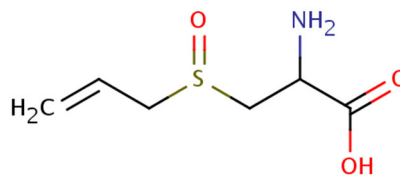
**S-(Allylthiol)-L-cysteine**



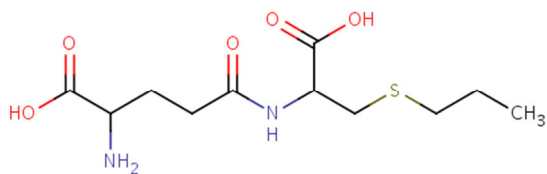
**S-2-Propenyl-1-propanesulfinothioate**



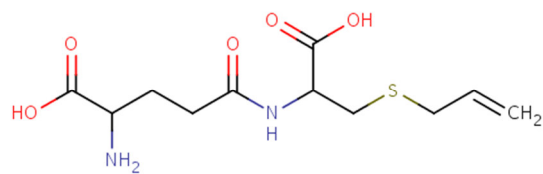
**(Z)-S-1-Propenylmethanesulfinothioate**



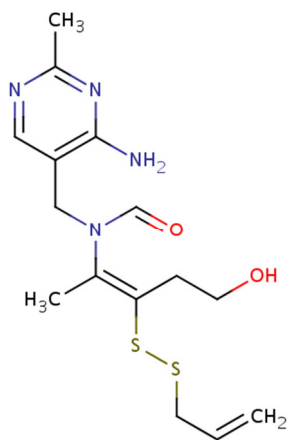
**(R)C (S) S-Alliin**



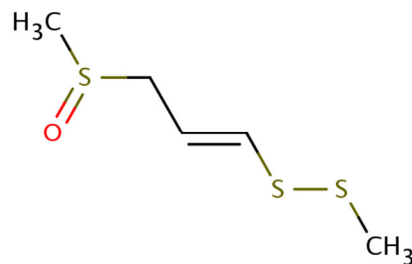
**N-γ-glutamyl-S-propylcysteine**



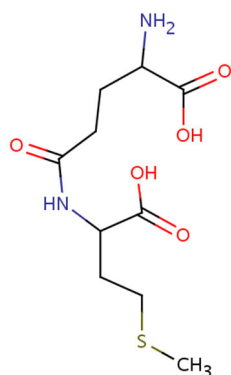
**N-γ-glutamyl-S-allylcysteine**



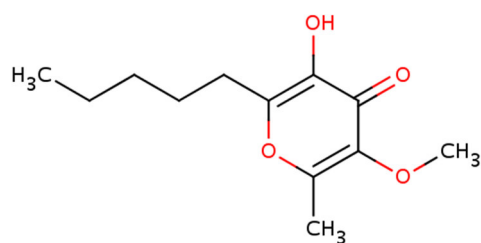
**Allithiamine**



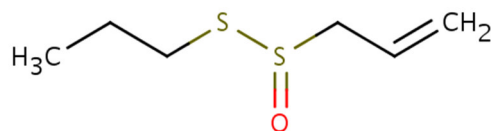
**(Z)- Methyl 3-(methylsulfinyl)-1- propenyl disulfide**



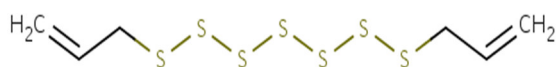
**N-γ-L-Glutamyl-L-methionine**



**Allixin: potencial nutracéutico**



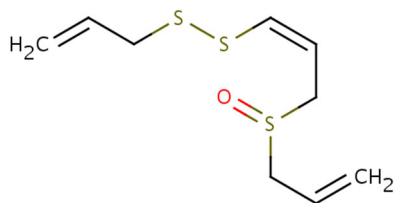
**S-Propyl 2-propene-1-sulfinothioate**



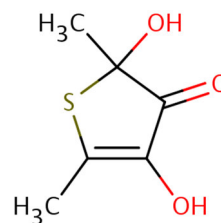
**Di-2-propenyl heptasulfide  
(antioxidante)**



**Di-2-propenyl pentasulfide  
(antioxidante)**



**Ajoeno (isómeros: E- and Z- 4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9- oxide**

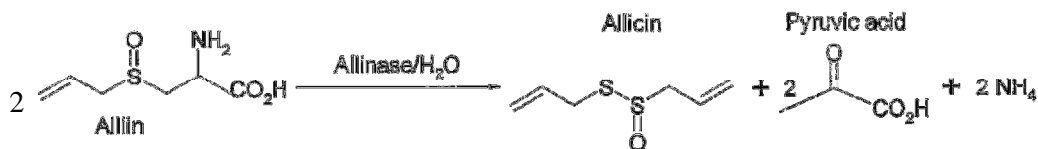


**Thiacremonone**

**Figura 1. Principales compuestos bioactivos azufrados del *Allium sativum*<sup>12</sup>**

Durante el almacenamiento de los bulbos a bajas temperaturas, la aliina se acumula naturalmente. En promedio el bulbo contiene hasta 0,9% de  $\gamma$ -glutamilcisteína y hasta 1,8% aliina. Además de estos principales compuestos azufrados los bulbos de ajos intactos contienen una pequeña cantidad de S-alil-cisteína (SAC) pero no de alicina.

El SAC es formado del catabolismo de  $\gamma$ -glutamil cisteína y se le ha reportado como el contribuyente de los beneficios saludables de sus preparaciones. Cuando el ajo es procesado sea cortándolo o triturándolo, o cuando es deshidratado, pulverizado y luego expuesto al agua, la enzima vacuolar aliinasa (E.C. 4.4.1.4, S-alquil-L-cisteína liasa), rápidamente actúa sobre la aliina, y forma alicina, de olor intenso.



En los bulbos de ajo, también se ha detectado la presencia de sales minerales (selenio), saponósidos esteroídicos, lectinas, fructosanas, pectinas, adenosina, vitaminas, flavonoides y otros compuestos fenólicos y, aminoácidos esenciales. También se

considera que contiene aceite esencial (debido a la formación de los compuestos azufrados volátiles), aunque éste no se encuentra preformado.

Los compuestos volátiles típicos del ajo triturado y de sus aceites esenciales incluyen el dialilsulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS), dialil trisulfuro, metil alil disulfuro, metil alil trisulfuro, 2-vinil-1,3-ditiina, 3-vinil-1,2-ditiina y *E,Z*-ajoeno <sup>13</sup>.

Es conocido que la alicina posee una variedad de efectos biológicos, como actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antitrombótica, anticancerígena, y antiateroesclerótica como también hipolipemiente y antihipertensión ocular. La mayor parte de sus efectos se relacionan con sus propiedades antioxidantes y su potente capacidad de modificar los grupos sulfhidrilos.

La alicina reacciona rápidamente con los grupos tioles libres, vía un reacción de intercambio de tioles en los enlaces disulfuros

### 2.3 S-Nitrosotiol: importancia biológica

Los S-Nitrosotioles son metabolitos endógenos del óxido nítrico que han sido detectados en el espacio intra y extracelular. Se ha descrito diversas funciones biológicas, categorizadas como: i) liberación del óxido nítrico (NO) ii) transnitrosación iii) S-tiolación iv) acción directa. Algunas de las funciones exhiben correlación con la clínica <sup>14</sup>.

La S-nitrosoalbúmina (SNO-albúmina) es el S-nitrosotiol de mayor circulación en el plasma, se dice que sirve de reservorio de NO en la circulación, tiene la propiedad de transportar y liberar NO en el lecho vascular para producir vasodilatación. La concentración fisiológica de la SNO-albúmina está en el orden de nanomolar, pero puede aumentar hasta concentraciones micromolar en condiciones patológicas <sup>15</sup>.

Las reacciones de transnitrosación las realiza con tioles plasmáticos de bajo peso molecular para formar intermediarios menos estables como el S-nitrosoglutation o S-nitrosocisteína, la que a su vez puede sufrir reducción o descomposición dependiente de metales de transición para liberar el NO. Este proceso puede ser importante desde el punto de vista terapéutico, ya que la cisteína (Cis) puede ser administrada mediante una infusión intravenosa de aminoácidos y como N-acetilcisteína (NAC), ésta última es usada en pacientes con enfermedades hepáticas severas.

La infusión de NAC en falla hepática aguda o en cirrosis causa una vasodilatación temporal y un incremento de GMPc plasmático <sup>16</sup>. A nivel intracelular, el NO también realiza el proceso de S-nitrosilación reversible y selectiva del grupo sulfhídrido de la cisteína de las proteínas. Estas modificaciones se producen bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Pueden regular funciones de las proteínas, señalizaciones redox y la viabilidad celular <sup>17</sup>.

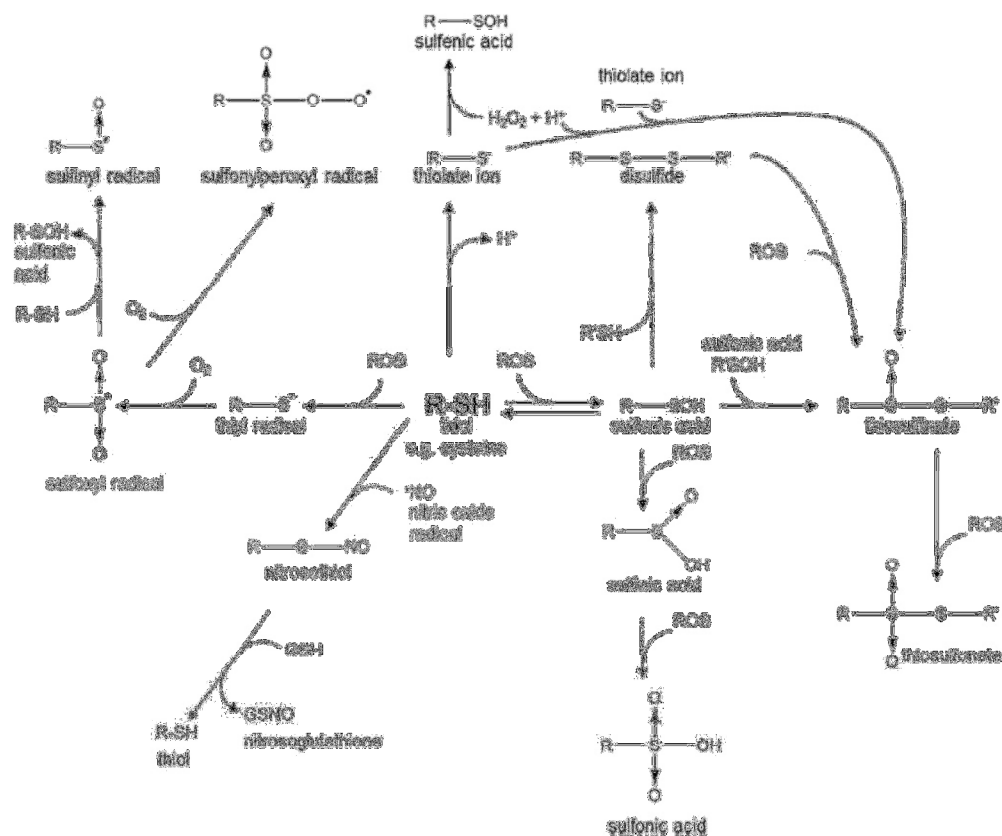
La S-nitrosilación constituye una modificación post translacional mediada por el estado redox que regula la función de las proteínas vía reacción covalente de especies derivadas del NO con el grupo tiol de las proteínas. Bajo condiciones fisiológicas, la S-nitrosilación puede ser un importante modulador de rutas de transducción de señales como lo son las regulaciones por fosforilación <sup>17</sup>.

Sin embargo, con la edad o las toxinas ambientales que generan excesivo NO, pueden producirse reacciones de S-nitrosilación aberrantes, que conducen a un desbalance entre la producción de ROS/RNS y la disponibilidad de los sistemas de defensa celular, incluyendo enzimas antioxidantes, glutatión y chaperonas moleculares resultando en una sobreabundancia de ROS/RNS que causan estrés oxidativo y nitrosativo.

Las neuronas son particularmente vulnerables a este daño oxidativo y nitrosativo debido a su elevada demanda de energía del metabolismo mitocondrial donde se generan las ROS/RNS y donde los sistemas de defensa no son lo suficiente para soportar la carga injuriante <sup>18</sup>.

El glutatión (GSH), tripéptido abundante en el organismo humano cumple un papel importante en el mantenimiento del estado reducido de los restos de cisteínas de diversas proteínas especialmente para mantener la integridad de la célula. El glutatión (GSH) reducido es considerado la primera línea de defensa antioxidante y el último radical “basura”. Su residuo de cisteína participa en reacciones como desplazamiento, adición nucleofílica, intercambio de tiol-disulfuro, provee equivalente reductor a la glutatión peroxidasa, y el GSSG formado es recuperado por la glutatión reductasa.

Tiene una buena capacidad de captar radicales libres formándose normalmente el radical glutatiónilo que puede combinarse con otros para formar GSSG. También participa en la regulación de la actividad biológica del NO, aunque no reaccionando



**Figura 2. Generación de varias especies azufradas reactivas desde un tiol el cual podría ser el glutatión o un grupo sulfhidrilo en una cisteína <sup>19</sup>.**

directamente sino formando nitrosotioles sobre la autoxidación del oxígeno. En presencia del óxido nítrico se forma el S-nitrosoglutathione.

Los metabolitos, alicina y glutatión compuestos azufrados, reaccionan rápidamente formando un disulfuro mixto S-allylmercaptoglutation (GSSA) <sup>20</sup>.



Glutathione

Alicin

S-Allylmercaptoglutation

Estas interacciones son importantes no solo como un mecanismo de defensa antioxidante sino también como parte de la red de reacciones de radicales que pueden

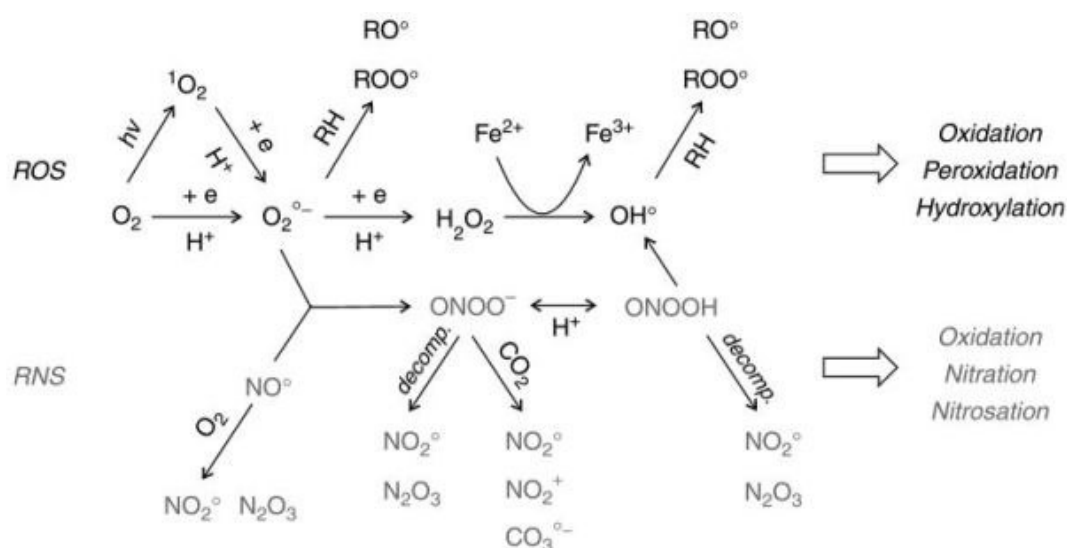
regular el estado de oxidación del glutatión y la cantidad de tiolación de proteínas, asimismo actuando como una fuente de superóxido y peróxido de hidrógeno<sup>21</sup>.

## 2.4 Radicales libres y especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs o ROS)

Los radicales libres (RL) son especies químicas con electrones desapareados en su capa de valencia, esta característica les permite participar en reacciones de cadena que comprende inicio, propagación y terminación. Generalmente son inestables, altamente reactivos y de tiempos de vida muy cortos; aunque depende de su estructura química y del medio donde se producen.

En los sistemas biológicos, los radicales libres suelen ser moléculas orgánicas o inorgánicas de vida corta, por lo mismo muy reactivas que se forman como producto del metabolismo y pueden causar efectos deletéreos sobre los componentes celulares: lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, así como sus derivados.

Las reacciones generadas por los radicales libres se relacionan frecuentemente con el metabolismo del oxígeno, la participación de enzimas oxidativas y metales de transición como hierro, cobre, manganeso y otros (Figuras 3 y 4). El daño oxidativo dependerá de la naturaleza del radical, de su sitio de generación, de las características de la molécula diana y de los mecanismos de respuesta.



**Figura 3. Principales especies reactivas del oxígeno (EROs) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) derivadas de la conversión biológica del oxígeno en superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ).** Tomado de: Michael AC, Borland LM, editors. CRC Press; 2007

Los RL se forman continuamente, desde la vida intrauterina hasta la muerte como producto del metabolismo en cada célula, funcionan como moléculas de señalización intracelular en diversos procesos biológicos como la apoptosis, modificación de la actividad de factores de transcripción que conducen a cambios en la expresión de genes y finalmente modificaciones en la respuesta celular. Este metabolismo normal que se produce en todas las células aeróbicas, existe en balance con los antioxidantes.

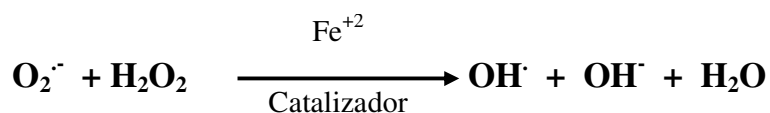
Sin embargo la formación de los RL en los sistemas biológicos está también estrechamente relacionada con alteraciones funcionales que conducen a diversas patologías como la aterosclerosis, diabetes y cáncer por citar algunos. En estos casos se trata de alteración de las concentraciones fisiológicas de las EROS, que en algunas situaciones pueden formar parte del origen de una enfermedad y en otras puede ser la consecuencia de ella. Hasta el momento no es fácil determinar el rol exacto.

Las EROs comprenden radicales libres y moléculas; son derivadas del metabolismo del oxígeno, su principal sitio de formación es la mitocondria, organela donde se realiza la respiración celular y se produce la mayor cantidad de agua metabólica por la reducción del oxígeno que adicionalmente produce estas especies potencialmente tóxicas.

Las EROs pueden causar daño tisular por la reacción con los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, produciendo lipoperoxidación, oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas y fragmentación o formación de enlaces covalentes cruzado en las ribonucleoproteínas, entre otros.

El radical aniónico superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), es el primer radical libre generado, luego se puede identificar al oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el altamente reactivo radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). (Figura 4)

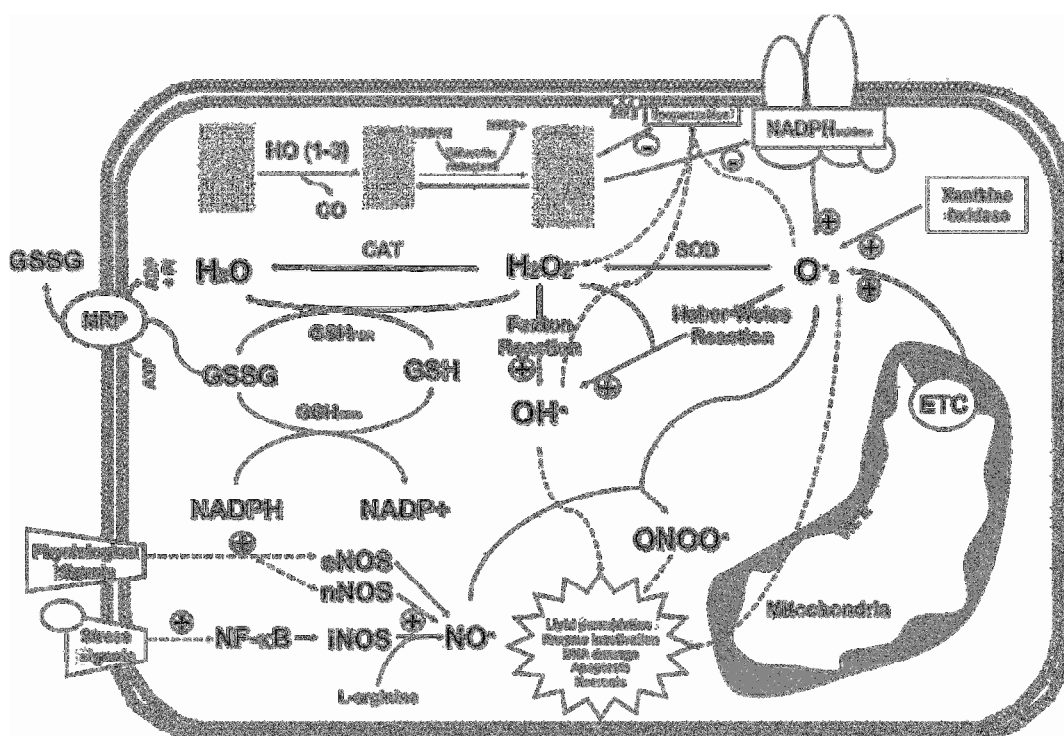
El radical superóxido oxida los “clusters” [4Fe-4S] de las deshidratasas, como la aconitasa, inactivándolas y liberando el Fe(II), el cual entonces reduce el peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo y anión hidroxilo.





### 2.4.1 EROs y enfermedades

Desde hace varias décadas existe una creciente producción científica que muestra el compromiso de las EROs en una serie de entidades clínicas como la diabetes, aterosclerosis, inflamación crónica, cáncer, infecciones virales, enfermedades neurodegenerativas y daño por isquemia-reperusión.



**Figura 4. Formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) y defensas antioxidantes.** Tomado de: Newsholme P, Homem PI et al. *Clinical Science*. 2010; 118.

El incremento de las ROS o los cambios en los niveles intracelulares de glutatión constituyen con frecuencia indicadores de cambios patológicos de un proceso de disregulación de cascadas de señales o expresión de genes.

La diabetes es una de las enfermedades con mayores estudios, y en ellos se ha mostrado que las EROs se producen en diversos tejidos. Las fuentes de EROs pueden ser de origen no enzimático y enzimático. Las reacciones de glicación no enzimática es una de ellas, así como el transporte de electrones en las mitocondrias y la actividad de NADPH oxidasa ligada a membrana.

Experimentalmente se ha observado que las proteínas glicadas pueden ser la hemoglobina, la albúmina, el lente del cristalino. La reacción produce base de Schiff, producto de Amadori y finalmente productos finales de glicación avanzada (AGEs) <sup>22</sup>.

A nivel mitocondrial la producción elevada de EROs se debe a una mayor activación de la cadena de transporte de electrones. La actividad de la NADPH oxidasa, primera enzima identificada como productora del radical superóxido expresada en fagocitos de mamíferos, es activada por varios estímulos como los AGEs, insulina y angiotensina II. (Figura 5). La actividad de esta enzima es también importante a nivel de la vasculatura por lo tanto desempeñaría un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis.

Reportes de investigación muestran que la producción de ROS en arterias coronarias humanas ateroscleróticas está asociada a la subunidad p22 phox de la NADPH oxidasa. También se ha reportado actividad incrementada de NADPH oxidasa, aumento de EROs y aterosclerosis en pacientes con síndrome metabólico, y probablemente la hiperinsulinemia también contribuye al incremento de la actividad de esta enzima <sup>23</sup>.

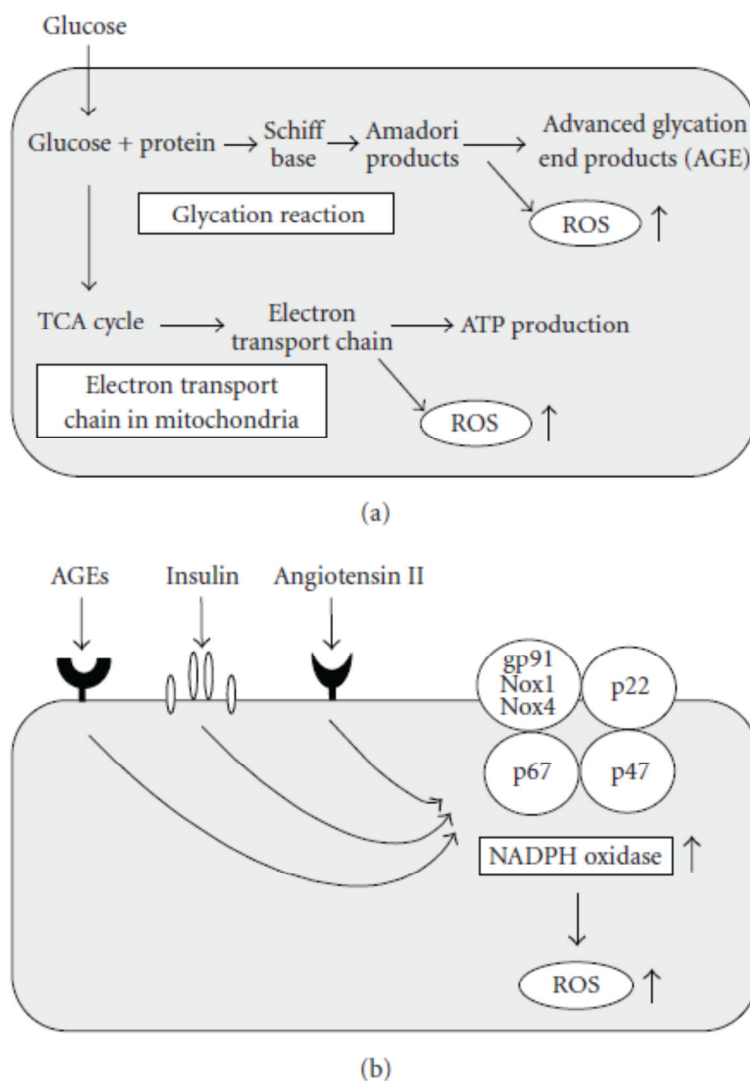
## **2.5 Estrés oxidativo y antioxidantes**

El estrés oxidativo ocurre cuando el balance de reacciones pro-oxidantes y antioxidantes es alterado por un exceso de EROs, una depleción de antioxidantes o ambos. Este desbalance tiene consecuencias citopatológicas que incluyen modificaciones en las proteínas, lípidos y ADN, produciendo lipoperoxidación, oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas y fragmentación o formación de enlaces covalentes cruzado en las ribonucleoproteínas, entre otros.

Las causas de este desbalance pueden ser de origen interno y externo. El ambiente de la mayor parte de los organismos no suele ser constante, todo organismo cuenta entonces con un potencial de defensa que le permite resistir a los estresores del medio ambiente.

Los diversos agentes estresantes pueden ser químicos, físicos y biológicos. En el caso de los químicos pueden ser orgánicos o inorgánicos, tienen diferentes modos de acción; pero los diversos agentes suelen tener un efecto común: su asociación al daño oxidativo en las células.

Las respuestas del organismo a estas injurias involucran una serie de estrategias como la regulación de proteínas antioxidantes (superóxido dismutasas, peroxidasas, catalasa,



**Figura 5: Incremento de ROS por varias rutas bajo condiciones diabéticas. (a) Producción de ROS bajo condiciones diabéticas. La hiperglicemia induce la formación de ROS a través de la reacción de glicación y la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. (b) Los AGEs, la insulina y la angiotensina II induce la producción de ROS por activación de la NADPH oxidasa ligada a membrana. Tomado de Kaneto H et al. *Mediators of Inflammation*. 2010.**

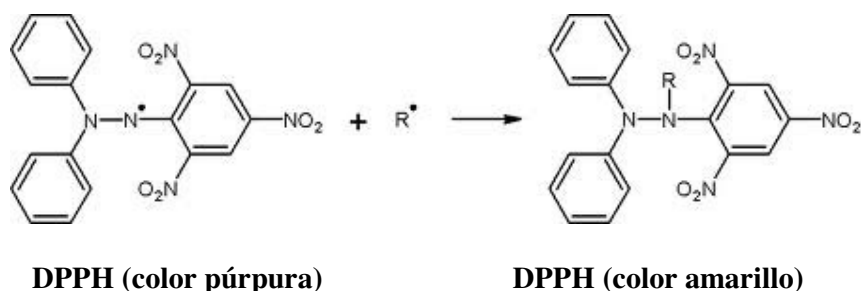
glutathion peroxidasa), enzimas de reparación de daños oxidativos (metionina sulfóxido dismutasas).

También forman parte de las estrategias, un grupo de biomoléculas de bajo peso molecular. Estas biomoléculas son de tipo endógenas (glutathión, ácido úrico, bilirrubina en el hombre) y exógenas (oxigenados como los polifenoles, a este grupo pertenecen

Otra familia de peroxidasa son las peroxiredoxinas, constituyen una familia ubicua de enzimas antioxidantes, también controlan los niveles de peróxido inducido por citoquinas las cuales median la transducción de señales en las células de mamíferos<sup>25</sup>.

Las propiedades antioxidantes *in vitro* son características que presentan algunas sustancias como los metabolitos secundarios de plantas o moléculas orgánicas endógenas cuando son enfrentadas a ciertas sustancias químicas que suelen ser agentes oxidantes o radicales estables. Pueden demostrarse en ensayos químicos o biológicos.

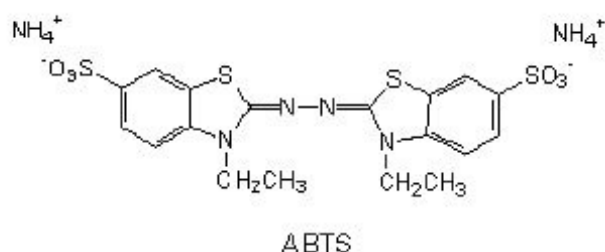
**A) DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo):** esta es una molécula radical estable de color púrpura, que se prepara en solución metanólica o etanólica. En esta forma su pico de absorbancia está entre 515 – 520 nm <sup>26</sup>. Cuando se coloca frente a una sustancia estabilizadora de radical libre, el radical DPPH pierde la coloración púrpura y se torna finalmente a una solución de color amarillo.



El método es sencillo, rápido y confiable, puede aplicarse a muestras de variada polaridad. Es uno de los métodos más reportados en los ensayos in vitro de capacidad captadora de radicales expresado usualmente como capacidad antioxidante total.

### B) ABTS (2,2' – azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato])

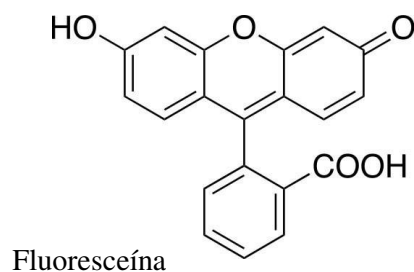
El radical  $\text{ABTS}^+$  es preparado por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio. La formación del radical está centrado en el nitrógeno exhibe un intenso color verde. Cuando se coloca frente a una sustancia estabilizadora de radical libre, el radical  $\text{ABTS}^+$  se decolora <sup>27</sup>. Al igual que el DPPH es útil para muestras de variada polaridad. Su máximo de absorbancia es a 734 nm.



### C) ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay, ensayo de capacidad de absorbancia del radical oxígeno)

Este ensayo está basado en el trabajo reportado por Glazer <sup>28</sup> y modificado por Cao y Prior <sup>29</sup>. El fundamento es el decaimiento de la fluorescencia de  $\beta$  o  $\rho$  - ficoeritrina (PE) medido en presencia de 2,2-azobis (2- amidinopropano) diclorhidrato. La fase lag o la constante de velocidad para la fluorescencia de la PE son usadas para determinar la capacidad antioxidante de la muestra en prueba.

El decaimiento de la fluorescencia de la PE es monitoreada en intervalos de dos minutos por 70 minutos (excitación, 546 nm; emisión, 565 nm).



## 2.6.2 Captación de especies reactivas del oxígeno (EROs, ROS)

### A) Captación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

El radical superóxido se forma cuando la molécula de oxígeno capta un electrón, este radical aniónico es altamente reactivo, de tiempo de vida muy corto. Tiene la capacidad de dismutarse espontáneamente. Existen diversos métodos químicos y bioquímicos para generarlo. En el laboratorio puede ser generado por sistemas como:

- Autoxidación de la epinefrina en medio alcalino (pH 10,2)<sup>30</sup>.
- Autoxidación del pirogalol en medio alcalino (pH 7,6 - 8,2)<sup>31,32</sup>.

### B) Descomposición de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

El peróxido de hidrógeno es una molécula con un tiempo de vida prolongada con capacidad de reacción si es colocada frente a una sustancia reductora (antioxidante). En este ensayo el peróxido de hidrógeno con absorbancia a 230 nm, puede ser enfrentado frente a una molécula antioxidante estándar o frente a un extracto con potencial antioxidante, en esta situación se produce la descomposición del peróxido de hidrógeno hasta oxígeno molecular y agua, lo que trae como consiguiente la disminución de la absorbancia<sup>33</sup>.

### C) Captación del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )

El radical hidroxilo tiene un tiempo de vida de  $10^{-9}$  s, por lo que su detección también se realiza de manera indirecta. El principio de este método se basa en la generación del radical mediante la reacción de Fenton que oxida a la deoxiribosa produciendo malondialdehído (MDA). El medio contiene deoxiribosa y hierro ferroso, la reacción se inicia agregando peróxido de hidrógeno. Después de un tiempo de reacción a 37°C, la reacción se detiene con ácido tricloroacético. El MDA se cuantifica con el ácido tiobarbitúrico (TBA). La lectura se realiza a 532 nm. Se emplea como sustancia de referencia el manitol<sup>34</sup>.

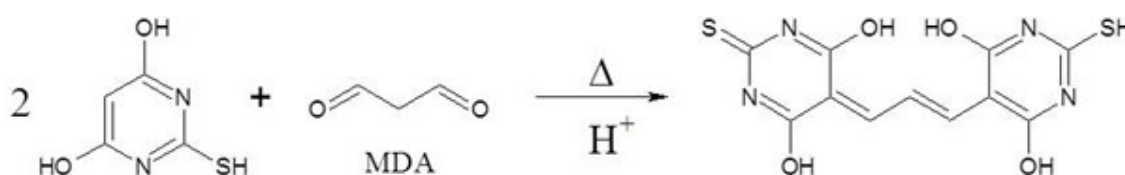
## 2.6.3 Indicadores de estrés oxidativo

### Lipoperoxidación (TBARS, MDA)

Es uno de los parámetros de estrés oxidativo más reportados en la literatura. El

malondialdehído (MDA) se forma por autooxidación y degradación enzimática de los ácidos grasos insaturados en las células. Este producto final secundario a este proceso oxidativo reacciona con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) vía una reacción de adición nucleofílica a grupo carbonilo en medio ácido, produciendo un cromógeno rojo cereza que se lee a 532 – 535 nm.

Es la técnica más usada a pesar de su relativa especificidad y su tendencia a sobrestimar el contenido de MDA, razón por la que también se le conoce como la prueba de TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico), porque otros compuestos carbonílicos también pueden reaccionar con este ácido <sup>35</sup>.



Ácido Tiobarbitúrico

$\lambda = 532 - 535 \text{ nm}$

Tomado de: <http://stores.eaglebio.com/tbars-cuvette-assay>

## 2.7 Respiración mitocondrial

La mitocondria es la organela citoplasmática donde se realiza la oxidación completa de sustancias del catabolismo. Esta oxidación se realiza en la membrana mitocondrial interna donde se produce el transporte de electrones a través de los complejos I al IV hacia el aceptor final, el oxígeno molecular, este proceso es denominado respiración mitocondrial. La reducción completa del oxígeno hasta la formación de agua no se produce completamente en un solo paso, se produce también, en un pequeño porcentaje, la reducción univalente generando la formación del radical superóxido. La mitocondria es la fuente principal de formación de radicales libres *in vivo*.

En la respiración mitocondrial, son los equivalentes reductores ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ,  $\text{FADH}_2$ ) los que inician las reacciones redox generando una gradiente protónica que permiten que finalmente se realice la fosforilación oxidativa que consiste en la formación de ATP

debido a la disipación de la gradiente a nivel del complejo V (ATPasa). Este proceso puede observarse *in vitro* bajo condiciones de laboratorio con mitocondrias aisladas y mantenidas en un medio isosmótico.

Dependiendo de los estados metabólicos de las mitocondrias, la respiración mitocondrial puede describirse en varias etapas, como se muestra en la Figura 6.

La fosforilación oxidativa se describe mediante parámetros, los más usados son a) velocidad de consumo de  $O_2$  en estado 3 (respiración activa,  $V_3$ ), b) velocidad de

<i>Estado</i>	<i>[Sustrato]</i>	<i>[O<sub>2</sub>]</i>	<i>[ADP]</i>	<i>Velocidad respiratoria</i>	<i>Factor limitante</i>
<b>1</b>	Bajo	+	Bajo	Lenta	ADP
<b>2</b>	0	+	Alto	Lenta	Sustrato
<b>3</b>	Alto	+	Alto	Rápida	Cadena respiratoria
<b>4</b>	Alto	+	Bajo	Lenta	ADP
<b>5</b>	Alto	0	Alto	0	$O_2$

**Figura 6. Estados Metabólicos de las mitocondrias.** Tomado del libro *Bioquímica: Díaz Zagoya – Juárez Oropeza (2007)*

consumo de  $O_2$  en estado 4 (respiración controlada,  $V_4$ ), c) índice de control respiratorio (ICR), que es el cociente  $V_3/V_4$ , mide el grado de acoplamiento y la integridad de la membrana interna de las mitocondrias aisladas. Suele ser entre 3 y 8, y d) índice P/O, refleja el número de fosfatos incorporados como ATP (fosforilación) por átomo ( $2e^-$ ) de oxígeno consumido (oxidación)<sup>36</sup>.

Su valor ha variado durante algunas décadas, actualmente se maneja valores de 2,5 cuando el equivalente reductor es NADH y 1,5 cuando los electrones provienen de  $FADH_2$ .



### III. METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación es de tipo cuantitativo y tiene dos etapas; la primera es observacional-analítico (12 ensayos) y la segunda parte corresponde a un diseño experimental *in vitro*.

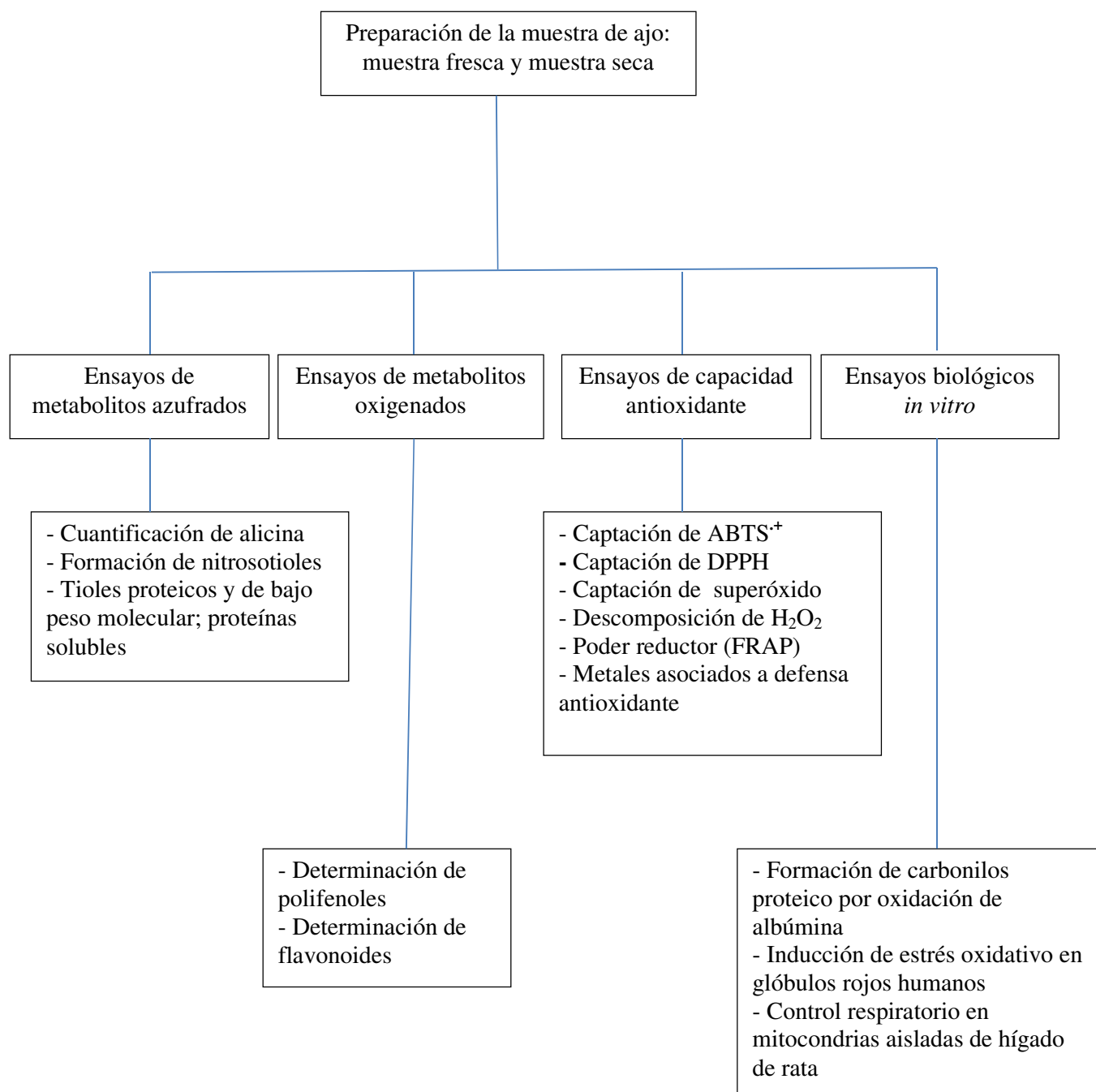
El estudio se realizó en los laboratorios del CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN de la Facultad de Medicina de la UNMSM, los análisis de elementos químicos fueron realizados en la FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERIA QUÍMICA de la UNMSM. Los ensayos de control respiratorio fueron realizados en el LABORATORIO DE BIOENERGÉTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD ESTADUAL DE CAMPINAS, BRASIL.

#### 3.1 Muestra biológica

Las muestras de ajo fueron del cultivar Huaralino obtenidas de la Estación Experimental Donoso de la ciudad de Huaral, en los meses de octubre y noviembre del año 2006 y 2007. Los bulbos tenían en promedio un peso de  $51,1 \pm 12$  g, diámetro de 5,72 cm y  $14 \pm 3$  bulbillos o dientes por bulbo, el peso promedio por diente fue de 3,64 g.

#### 3.2 Preparación del extracto de ajo

Los dientes de ajo fueron pelados y lavados con agua de grifería y al final con agua bidestilada. La preparación de todos los extractos para las determinaciones en medio acuoso se realizaron con agua bidestilada; la concentración se indica en cada ensayo.



**Figura 7.** Flujograma de los ensayos realizados en la muestra de *Allium sativum* variedad Huaralino.

### 3.3 Reactivos:

Los reactivos empleados fueron adquiridos de las casas Sigma y Merck.

Ácido ascórbico; Reactivo Folin Ciocalteu; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); Pirogallol, Glutation reducido, Ácido Glioxílico, Ácido Ditionitrobenzoico (DTNB). Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX<sup>R</sup>); Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), 4-Mercapto piridina (4-MP) Ácido Gálico, Quercetina, Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido (NADPH), Azida de Sodio, Persulfato de potasio, Nitrito de Sodio, Albúmina Sérica Bovina, Cloruro Férrico, Ferricianuro de Potasio, Ácido Tricloroacético, Metanol, Guanidina, Dinitrofenilhidrazina. Deoxirribosa, Peróxido de Hidrógeno, Sulfato Ferroso, Ácido Acético glacial, Ácido Clorhídrico, Fosfato Disódico, Fosfato Monopotásico, Cloruro de Sodio, Cloruro de Potasio.



**Figura 8.** Bulbos de *Allium sativum* variedad Huaralino (Estación Donoso, Huaral).

### 3.4 Equipos:

Balanza analítica (Sartorius BP 221S), centrífuga clínica (Centrifuge PLC Series), centrífuga refrigerada (Sorvall RC2-B, rotor SS34), espectrofotómetro (Spectro UV-VIS, doublé beam PC, LaboMed INC), centrífuga para microtubos (PowerSpin<sup>TM</sup> BX Centrifuge), baño maría (Tomos CDK-S22) y baño maría con agitación (GCA Precision Scientific), estufa (KertLab ODHG-9030A), potenciómetro (Hanna Instruments, pH 211), respirómetro de alta resolución (High Resolution Respirometry, Oxygraph-2k; Oroboros Instrument), espectrofotómetro de absorción atómica (ICP-MS).

### 3.5 Análisis realizados:

1. Cuantificación de Alicina
2. Formación de S – Nitrosotioles
3. Determinación de proteínas solubles
4. Determinación de tioles proteicos y tioles de bajo peso molecular.
5. Determinación de flavonoides
6. Determinación de polifenoles
7. Captación del radical catiónico ABTS<sup>+</sup>(Capacidad antioxidante total)
8. Captación del radical libre DPPH (Capacidad antioxidante total)
9. Captación del radical libre superóxido
10. Capacidad de descomposición del peróxido de hidrógeno (CDP)
11. Medida del poder reductor (FRAP)
12. Análisis de metales asociados a defensa antioxidante
13. Formación de carbonilos proteico por oxidación de albúmina
14. Inducción de estrés oxidativo: con un sistema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en glóbulos rojos humanos.
15. Control respiratorio en estado fosforilante y de reposo en mitocondrias de hígado de rata Wistar.

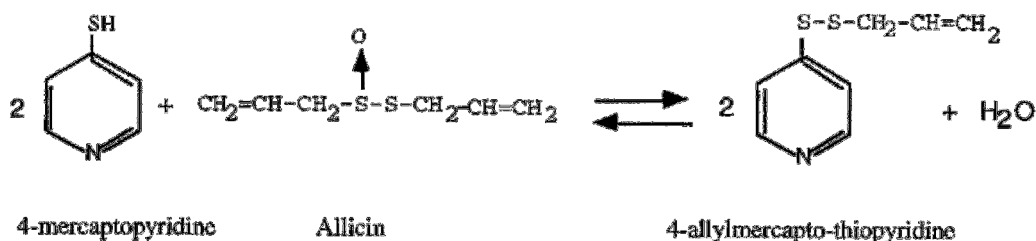
### 3.5.1 Cuantificación espectrofotométrica de alicina

#### Preparación de la muestra de ajo

- La muestra de dientes de ajo pelados (140 g) fue licuada añadiéndole agua bidestilada hasta un volumen de 300 mL, se filtró con tela de tejido muy fino y luego con papel de filtro Watman; se obtuvo un extracto de 46.67 % w/v.
- En este extracto se cuantificó espectrofotométricamente la alicina, mediante el método de Miron et al.<sup>37</sup>.

#### Método de Miron: 4 – mercaptopiridina (4-MP)

El fundamento es la reacción del 4-MP (longitud de onda = 324 nm) con el enlace disulfuro activado de los tiosulfatos – S(O) – S –, formando un enlace disulfuro mixto, 4 – alilmercaptotipiridina, sin absorbancia en esta región. Entonces la reacción del ensayo se mide por disminución de la absorbancia a 324 nm. El coeficiente de extinción molar a 324 nm es  $39600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$



Las fórmulas aplicadas fueron:

$$[\text{allicina}] \text{ M} = [A_{324 \text{ nm}} (4\text{-MP sin ajo}) - A_{324 \text{ nm}} (4\text{-MP con ajo})] \times 3,08 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[\text{allicina}] \text{ mg/mL} = [A_{324 \text{ nm}} (4\text{-MP sin ajo}) - A_{324 \text{ nm}} (4\text{-MP con ajo})] \times 0,499$$

La solución de 4-Mercaptopiridina  $10^{-4} \text{ M}$  se preparó en buffer fosfato de sodio 50 mM, 2mM EDTA, pH 7,2. Muestra: del extracto stock (466,7 mg/mL), se preparó una dilución 1/10.

**Tabla 1. Preparación de los tubos de reacción para la determinación de alicina**

<b>Extracto 46,67 mg/mL</b> <b>(mL)</b>	<b>Buffer</b> <b>(mL)</b>	<b>Concentración</b> <b>(mg/mL)</b>
0,4	0,6	18,67
0,3	0,7	14,0
0,2	0,8	9,33
0,1	0,9	4,67
0,05	0,95	2,33

El tubo de reacción contenía 0,98 mL de 4-MP y 0,02 mL de extracto. Se leyó a 324 nm durante 15, 30 y 45 minutos.

### 3.5.2 Formación de S - nitrosotioles

Los nitrosotioles son compuestos que se miden a 334 nm y el coeficiente de extinción a esta longitud de onda es  $800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  <sup>38</sup>.

La formación de nitrosotioles se probó con Glutación, albúmina y *Allium sativum* variedad Huaralino frente al nitrito de sodio. El sistema consistió en:

**Tabla 2. Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Glutación - Nitrito**

	Blco Nitrito	Blanco GSH	GSH 0,35	GSH 0,4	GSH 0,45
Buffer Fosfato de Sodio 75 mM pH 7,4	0,94	0,93	0,87	0,86	0,85
GSH 5,0 mM (mL)	-	0,07	0,07	0,08	0,09
Nitrito 15 mM (mL)	0,06	-	0,06	0,06	0,06

**Tabla 3. Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Allium - Nitrito**

	Blco Nitrito	Blanco All	All 0,24	All 0,36	All 0,48
Buffer Fosfato de Sodio 75mM pH 7,4	0,94	0,94	0,9	0,88	0,86
Allium 6,0 mg/mL (mL)	-	0,06	0,04	0,06	0,08
Nitrito 15 mM (mL)	0,06	-	0,06	0,06	0,06

**Tabla 4. Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Albúmina - Nitrito**

	Blco Nitrito	Blanco Alb	Alb 0,3	Alb 0,4	Alb 0,5
Buffer Fosfato de Sodio 75 mM pH 7,4	0,94	0,96	0,91	0,9	0,89
Albúmina 10,0 mg/mL (mL)	-	0,04	0,03	0,04	0,05
Nitrito 15 mM (mL)	0,06	-	0,06	0,06	0,06

Los tres sistemas se leyeron a 334 nm después de una incubación a 37°C por dos horas.

**Tabla 5. Formación de nitrosotioles empleando el sistema de Allium -**